

Mise en évidence d'un baculovirus de polyédrose nucléaire chez *Latoia viridissima* Lépidoptère Limacodidae ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte-d'Ivoire.

N.K. KOUASSI (1), G. FEDIERE (1), X. LERY (1), R. PHILIPPE (2), M. BERGOIN (3)

Résumé. — Parmi les défoliateurs du palmier à huile, le Lépidoptère Limacodidae *Latoia viridissima* est un des plus fréquemment observé en Côte-d'Ivoire. Pendant les pullulations de cette espèce, des épizooties naturelles nous ont permis de mettre en évidence un Baculovirus de polyédrose nucléaire. Ce dernier infecte cette espèce en association avec un Picornavirus précédemment signalé. Les polyèdres, de forme globuleuse, mesurent entre 1 et 1,5 μm de diamètre et sont localisés dans le noyau des cellules intestinales. Ils renferment des virions de 340 nm de long et de 50 nm de diamètre, pris dans une trame polypeptidique constitué principalement de polyédrine (PM = 30000 daltons). Le génome de Baculovirus est un ADN bicaténaire de PM estimé à 62×10^6 daltons soit 94 kb. L'action des enzymes de restriction *Eco* RI et *Bam* HI sur cet ADN génère respectivement 15 et 8 fragments. L'infection de cultures primaires d'hémocytes de *Latoia viridissima*, à partir de virus extrait par dissolution des polyèdres, a été réussie au laboratoire.

Mots-clés : *Latoia viridissima*, Entomopathogènes, Baculovirus de polyédrose nucléaire.

INTRODUCTION

En Asie, en Amérique et en Afrique, les Lépidoptères Limacodidae sont cités parmi les plus grands défoliateurs de palmier à huile et de cocotiers (Genty *et al*, 1978, Mariau *et al*, 1981, Cock *et al*, 1987). Plusieurs espèces de cette famille ont déjà fait l'objet d'études spécifiques concernant la mise en évidence de virus responsables d'épizooties (Desmiers de Chenon *et al*, 1988).

Dans le cadre de la lutte biologique utilisant les agents entomopathogènes, plusieurs types de virus à ARN ou à ADN ont été déjà identifiés. Il s'agit de Baculovirus, de Densovirus, de Picornavirus et de virus du groupe β nudaurelia.

En Côte-d'Ivoire, ont déjà été décrits un Densovirus chez *Casphalia extranea* (Fedierre, 1981) et un Picornavirus chez *Latoia viridissima* (Fedierre, 1983). Ces deux viroses sont à l'origine de fortes épizooties naturelles déclenchées lors de la pullulation de ces insectes en plantation. A la suite d'une infection expérimentale de larves saines de *Latoia viridissima* par un broyat de larves virosées, l'examen en microscopie électronique de fragments d'intestin moyen a révélé la présence de polyèdres dans les noyaux des cellules.

L'étude que nous présentons est consacrée à la description ultrastructurale de ce nouveau Baculovirus isolé chez *Latoia viridissima* ainsi qu'à sa caractérisation biochimique. Tous les résultats obtenus, nous ont permis de confirmer son appartenance au groupe des Baculovirus de polyédrose nucléaire selon les critères de Summers (1977).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Méthode d'infection

Les larves de *Latoia viridissima* sont contaminées par badigeonage des folioles leur servant de nourriture, à l'aide d'une suspension de polyèdres (infection per os).

Techniques de microscopie électronique

Les suspensions de virus purifiés sont déposées sur une grille recouverte d'un film collodion carboné et contrastées négativement à l'acide phosphotungstique à 1 %, ou à l'acétate d'uranyle à 2 %, pH 7,4 (Brenner et Horne, 1959).

Pour la préparation de coupes ultra-fines, des fragments de différents tissus prélevés sur des larves de *Latoia viridissima* présentant des symptômes de la maladie, sont fixés dans la glutaraldéhyde à 2 % en tampon cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,4 pendant 2h à 4 °C. Les pièces fixées sont incluses dans l'épon après post-fixation dans l'acide osmique à 1 % et déshydratation à l'acétone.

Ces coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon la méthode de Reynolds (1963). Les préparations sont observées au microscope électronique.

Purification des polyèdres

Les larves sont broyées dans du tampon Tris 0,05M, pH 7,8, contenant 0,06 % de SDS (sodium dodécyl sulfate). Après filtration sur mousseline et clarification, les polyèdres sont mis au culot par centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes. Le culot de polyèdres repris dans du tampon est lavé trois fois dans le tampon Tris avant d'être déposé sur gradient de saccharose (40 % - 60 % poids/poids, 100000 g,

(1) Laboratoire d'Entomovirologie B.P. 51, Abidjan - Côte-d'Ivoire

(2) Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO), station de La Mé, BP 13, Bingerville - Côte-d'Ivoire

(3) Station de recherches de pathologie comparée INRA - CNRS 30380 Saint-Christol-lès-Aïès - France.

30 minutes). La bande de polyèdres est recueillie et diluée dans du tampon Tris. Les polyèdres sont mis au culot à 75000 g pendant 40 minutes et conservés dans le même tampon à 4 °C.

Purification des virions

Les virions sont libérés par dissolution des polyèdres dans une solution de thioglycolate-carbonate de sodium 0.125M, pH 10,5 à 60 °C pendant 15 minutes. Après adjonction de 2 volumes de tampon Tris, la suspension est mise 5 minutes dans la glace pour arrêter la réaction, puis clarifiée à 2000 g pendant 4 minutes. Le surnageant contenant les virions est centrifugé en gradient de saccharose (20 % - 50 % poids/poids) à 60000 g pendant 2 heures. Les virions, qui séparent en 3 bandes, sont prélevés à l'aide d'une pompe péristaltique couplée à un système analyseur (spectrophotomètre Beckman UV 5230), puis mis au culot à 50000 g pendant 2 heures. Les virions sont conservés dans du tampon Tris-EDTA à 20 °C.

Extraction de l'ADN viral

A 1 ml de suspension de virions, on ajoute 20 µl d'une solution de SDS concentré (250mg/ml). Après incubation au bain-marie à 60 °C pendant 15 minutes, l'ADN est purifié par extraction phénolique. L'ADN est dialysé contre du tampon TE (Tris 0,01M, EDTA dissodique 0,001M, pH 8) pendant 48 heures en changeant les bains toutes les 12 heures puis précipité une nuit à -20 °C à l'acétate de sodium 0,3M final en présence de 2 volumes d'éthanol absolu à -20 °C. L'ADN est mis au culot à 8000 g, lavé à l'éthanol 70 % à -20 °C, séché puis conservé dans du tampon TE à -20 °C.

Analyse des protéines virales

Le nombre et le poids moléculaire des protéines virales (polyèdres et virions) ont été déterminés par électrophorèse en gels de polyacrylamide-SDS (8 %) selon la méthode Weber et Osborn (1969). Le mélange suspension virale-solution dénaturante (2V/1V) est chauffé à 100 °C pendant 5 minutes avant dépôt dans les puits du gel. Le marqueur utilisé est constitué de 7 protéines de référence : la sérum-albumine de boeuf (PM = 66000), l'ovalbumine (PM = 45000), le glyceraldéhyde 3 P.-déshydrogénase (PM = 36000), l'anhydrase carbonique (PM = 29000), le trypsino-gène (PM = 24000), l'inhibiteur de la trypsine (PM = 20100), la lactalbumine (PM = 14200).

Analyse de l'ADN par les enzymes de restriction

L'ADN a été coupé par des enzymes de restriction dans les conditions décrites par Maniatis *et al* (1982). Les enzymes utilisées, *Eco* RI et *Bam* HI, proviennent de Boehringer Mannheim. La quantité d'enzyme utilisée correspond à 2 à 3 unités/µg d'ADN. La migration des fragments d'ADN est réalisée dans un gel à 0,6% ou 0,7% d'agarose en cuve horizontale de 15 x 20 cm en présence de tampon TAE (Tris acétate 0,04M ; EDTA 0,001M) contenant 0,5 µl/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse se déroule pendant une nuit à 40V (32mA). Les poids moléculaires des fragments sont estimés en prenant pour référence l'ADN du bactériophage lambda digéré par les enzymes *Eco* RI et *Bam* HI.

RESULTATS

Microscopie électronique

Dans les coupes histologiques des larves infectées par le Baculovirus, on remarque la présence de polyèdres (corps d'inclusion globuleux) au niveau des cellules constituant la paroi de l'intestin moyen de la larve. Celui-ci présente des



FIG. 1. — Coupe ultrafine dans une cellule de l'intestin moyen de larve de *L. viridis* atteinte par la polyédrose nucléaire (x 32000) N = noyau, P = polyèdres, Bl = Baculovirus libres, C = Cytoplasme — (Ultrafine section of midgut cell from a *L. viridis* larva infected by nuclear polyhedrosis (x32,000) N = nucleus, P = Polyhedra, Bl = Free Baculoviruses, C = Cytoplasm)



FIG. 2. — Suspension purifiée de Baculovirus de polyédrose nucléaire isolés chez *L. viridis* (x 40000) Examen au microscope électronique réalisé après contraste négatif à l'acétate d'uranyle 2%. — (Purified suspension of nuclear polyhedrosis Baculoviruses isolated from *L. viridis* (x 40,000) Examination under the electron microscope after negative contrasting with 2% uranyl acetate)

cellules à noyaux hypertrophiés renfermant des amas de polyèdres (Fig. 1). L'examen d'autres tissus connus pour être classiquement infectés par les Baculovirus, tels le tissu adipeux, les tubes de Malpighie ou l'hypoderme, s'est révélé négatif.

Structure du virus

L'examen de suspensions de virus purifiés contrastées à l'acétate d'uranyle révèle des virions en bâtonnets mesurant 340 nm de long et 50 nm de diamètre (Fig. 2). On observe à côté de virions complets possédant une enveloppe, des particules dégradées, sous la forme de nucléocapsides libres, de plus petit diamètre. Certaines de ces nucléocapsides pénétrées par le colorant, suggèrent qu'elles ont subi des altérations.

Analyse électrophorétique des protéines virales

Les profils électrophorétiques résultant de la solubilisation des polyèdres sont complexes (Fig. 3). Une protéine majeure possédant un PM de 30000 daltons correspond vraisemblablement à la polyédrine (protéine du polyèdre). Aux moins 11 polypeptides de poids moléculaire 14000, 16000, 18000, 19500, 21000, 25000, 28000, 38000, 52000, 60000 et 70000 daltons correspondent aux constituants majeurs de la capside des virions.

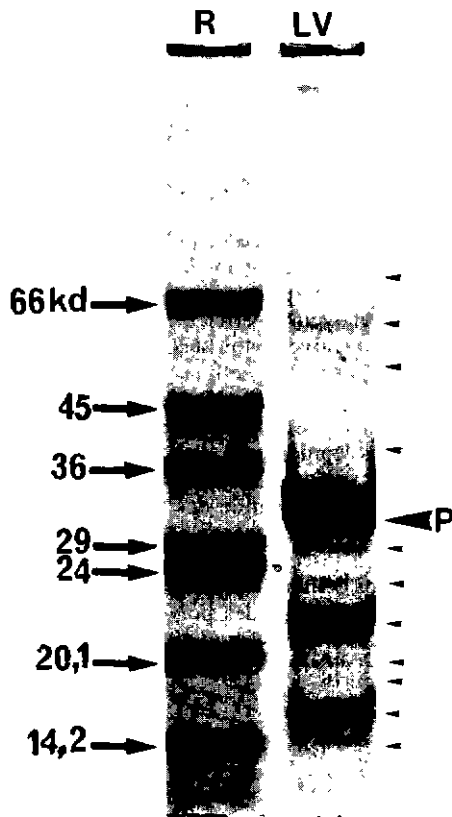


FIG. 3. — Electrophorégramme de la polyédrine et des polypeptides du Baculovirus de *L. viridissima* en gel polyacrylamide 8%. — (Electrophoregram of the polyhedrin and polypeptides of the *Latoia viridissima* Baculovirus in 8% polyacrylamide gel.).

Analyse de l'ADN viral

Les fragments d'ADN générés par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Bam* HI sont présentés sur les figures 4. Ces fragments sont au nombre de 15 pour l'enzyme *Eco* RI et de 8 pour l'enzyme *Bam* HI. Le poids moléculaire de ces fragments, estimé utilisant comme marqueur les fragments *Eco* RI et *Bam* HI de l'ADN du phage lambda, est donné dans le tableau I.



FIG. 4a. — Electrophorégramme de l'ADN du Baculovirus de polyédrose nucléaire de *L. viridissima* digérée par les enzymes *Eco* RI et *Bam* HI — R = ADN du phage lambda coupé par les enzymes *Hind* III et *Eco* RI (Electrophoregram of the *L. viridissima* nuclear polyhedrosis Baculovirus DNA digested by enzymes *Eco* RI and *Bam* HI) (R = DNA of bacteriophage lambda cleaved with enzymes *Hind* III and *Eco* RI)

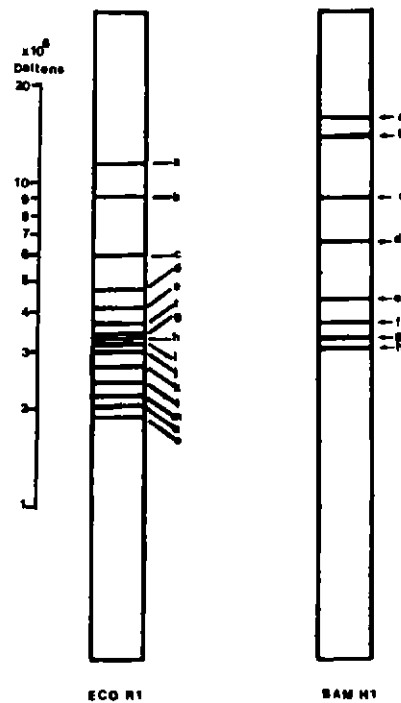


FIG. 4b. — Schema des profils électrophorétiques *Eco* RI et *Bam* HI de l'ADN du Baculovirus de *L. viridissima* avec échelle logarithmique des poids moléculaires. — (Diagram of the *Eco* RI and *Bam* HI electrophoretic profiles of the DNA from the *L. viridissima* Baculovirus, with a logarithmic scale of molecular weights.).

La somme de ces poids moléculaires permet d'assigner au génome du Baculovirus de *Latoia viridissima* une taille moyenne de $61,6 \times 10^6$ daltons, soit environ 93 kilos paires de bases.

Multiplication du virus en cultures primaires d'hémocytes de *Latoia viridissima*.

En l'absence de techniques d'élevage de *Latoia viridissima* sur milieu artificiel, la multiplication des virus qui lui sont inféodés ne peut se faire qu'en infestant des larves récoltées dans la nature. Or l'état sanitaire des larves est difficilement contrôlable, ce qui rend aléatoire les infections expérimentales. L'obtention d'une lignée cellulaire devrait permettre de contourner ces difficultés. Dans ce but nous avons mis en culture des hémocytes de cet insecte et une lignée cellulaire en cours d'établissement nous a permis de faire des infections (Kouassi *et al* 1989). Des essais d'infection de cultures primaires d'hémocytes avec une suspension purifiée du Baculovirus se sont révélés positifs. Des noyaux présentant une hypertrophie caractéristique et l'accumulation de polyèdres ont été obtenus.

TABLEAU I. — Poids moléculaire des fragments de l'ADN du Baculovirus de la polyédrose nucléaire de *L. viridissima*, générés par les endonucléases de restriction *Eco* RI et *Bam* HI. — (*Molecular weights of the DNA of the *L. viridissima* polyhedrosis Baculovirus, generated by the restriction endonucleases *Eco* RI and *Bam* HI.*)

Symbole des segments	<i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI
	× 10 ⁶ daltons	× 10 ⁶ daltons
A	11.50	16.00
B	9.00	14.00
C	6.00	9.00
D	4.70	6.60
E	4.10	4.40
F	3.70	3.70
G	3.40	3.30
H	3.30	3.10
I	3.20	
J	3.00	
K	2.70	
L	2.40	
M	2.20	
N	2.05	
O	1.90	
Total	63.15	60.10

DISCUSSION ET CONCLUSION

Par sa structure en bâtonnet, son mode d'inclusion dans des corps protéiniques nucléaires, sa composition polypeptidique complexe, son génome constitué d'un ADN de poids moléculaire élevé, le virus que nous venons de décrire présente les caractéristiques essentielles des Baculovirus de polyédrose nucléaire (Croizier et Croizier 1977 ; Summers 1977 ; Matthews 1982).

Bien qu'encore fragmentaires, les premiers résultats de l'analyse de l'ADN viral par enzymes de restriction (*Eco* RI et *Bam* HI) ouvrent la voie aux travaux de cartographie et de séquençage de cet ADN. De même, l'obtention du cycle de réplication du virus en cultures primaires d'hémocytes permet d'envisager lorsque la lignée cellulaire sera établie, la production de virus et son utilisation, soit en lutte biologique soit comme vecteurs d'expression.

Il est intéressant de noter que différents Baculovirus de polyédrose nucléaire et de granuloose ont déjà été isolés chez d'autres espèces de Lépidoptères de la famille des Limacodidae (Genty *et al* 1978 ; Cock 1985 ; Smith et Xeros 1954 ; Thomas et Poinar 1973 ; Ting-Wei *et al* 1980 ; Van der Geest et Van der Laan 1972). Ces virus semblent jouer un rôle appréciable dans la régulation des populations naturelles de leurs hôtes (Huber 1986).

Il n'est pas rare d'observer chez les insectes, associés aux virus de polyédrose nucléaire, de petits virus à ARN au cours d'infections doubles (Jacquemard *et al* 1985). Tel est le cas chez *L. viridissima* du Picornavirus (Fediere 1983) associé au virus que nous venons de décrire. La présence de ces petits virus dans les lots de larves infectées naturellement ou expérimentalement avec des virus de polyédrose nucléaire, soulève un doute quant au degré de pathogénicité lié à l'un ou l'autre des deux virus.

Une propriété originale de la polyédrose nucléaire que nous avons mis en évidence chez *L. viridissima* réside dans sa spécificité tissulaire apparemment limitée aux seules cellules de l'intestin moyen. En effet, bien que nous n'ayons pas fait une étude exhaustive de tous les tissus de la larve, l'absence de polyèdres dans les cellules du tissu adipeux ou de l'hypoderme, par exemple, semble indiquer que l'on n'a pas affaire ici à une polyédrose nucléaire polyorganotropique classique chez les lépidoptères (Benz 1963 ; Hamm 1968). Chez ces derniers, en effet, si l'intestin moyen est le siège du premier cycle de réplication des Baculovirus, la formation de polyèdres dans cet organe est rare. Par contre, dans d'autres groupes d'insectes, notamment les Diptères et les Hyménoptères, les cellules intestinales sont le site essentiel ou unique de la formation des polyèdres (Bird et Whalen 1953 ; Federici 1980 ; Stiles *et al* 1983 ; Brown 1982).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BENZ G (1963) — A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (STAUDINGER), *J Invertbr Pathol*, **54** 215
- [2] BIRD F T, WHALEN M M (1953) — A virus disease of the european pine sawfly, *Neodiprion sertifer* Geoffr., *can. Entomol*, **85** 433
- [3] BRENNER S., HORNE R W (1959) — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem Biophys Acta* **34**, 103-110.
- [4] BROWN (D.A.). (1982). — Two naturally occurring polyhedrosis virus variants of *neodiprion sertifer* Geoffr (Hymenoptera, Diprionidae). *Applied and environmental microbiology* **43** (1) 65-69
- [5] COCK M.J.W., GODFRAY H.C.J (1985) — Report program for the biological control of selected coconut pest in the philippines CIBC, Imperial College UK, 75 p
- [6] COCK M.J.W., GODFRAY H.C.J, HOLLOWAY J.D. (1987). — Slug and nettle caterpillars : the biology, taxonomy and control of the Limacodidae of economic importance on palms in south-east Asia. *C A B. International Wallingford*. 270 p
- [7] CROIZIER G, CROIZIER L (1977). Evaluation du poids moléculaire de la protéine des corps d'inclusion de divers Baculovirus d'insectes. *Arch Virol.*, **55**, 247-250

- [8] DESMIER de CHENON R., MARIAU D., MONSARRAT P., FEDIERE G., SIPAYUNG A. (1988). — Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier. *Oléagineux*, **43**, (3), 107-117.
- [9] FEDIERE G., DESMIER de CHENON R., MARIAU D., MONSARRAT P. (1981). — Mise en évidence de maladies à épizootie de type densucléose chez deux chenilles de Limacodidae, Lépidoptères phyllophages du palmier à huile et du cocotier en Côte-d'Ivoire. *Colloq Intern. Protec Cult Trop*, Lyon, France 8-10 juillet p. 62.
- [10] FEDIERE G. (1983). — Recherches sur des viroses épizootiques de Lépidoptères Limacodidae, ravageurs de Palmacées Thèse de Doctorat 3e cycle, Université du Languedoc, Montpellier 130P.
- [11] FEDERICI B.A. (1980). — Mosquito baculovirus: sequence of morphogenesis and ultrastructure of the virion. *Virology*, **100**, 1.
- [12] GENTY P., DESMIER de CHENON R., MORIN J.P., KORYTKOWSKI C.A. (1978). — Les ravageurs du palmier à huile en Amérique latine. *Lepidoptera : Limacodidae. Oléagineux*, **33**, (7), 326-419.
- [13] HAMM J.J. (1968). — Comparative histopathology of a granulosis and nuclear polyhedrosis of Spodoptera frugiperda, *J Invertebr Pathol* **10**, 320.
- [14] HUBER J. (1986). — Use of Baculovirus in pest management programs *The biology of Baculoviruses II Practical Application for insect Control*.
- [15] JACQUEMARD P., CROIZIER G., AMARIGIER A., VEYRUNES J.C., CROIZIER L., BORDAT D., VERCAMBRE B. (1985). — Présence de trois virus chez *Sesamia calamistis* Hampson (Lépidoptère Agrotidae) à l'île de la réunion, *Agron Trop.*, **40**, 66-71.
- [16] KOUASSI N. K., LERY X., FEDIERE G. AND HERBERT S. (1991). — A new permissive cell culture obtained from *Latoya viridissima* (Lepidoptera Limacodidae) journal of invertebrate pathology (sous presse).
- [17] MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). — Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New-York*, 545 p.
- [18] MARIAU D., DESMIER de CHENON R., JULIA J.F., PHILIPPE R. (1981). — Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale. *Oléagineux*, **36**, (4) 169-228.
- [19] MATTHEWS R.E.F. (1982). — Classification and nomenclature of viruses (Fourth report of the I.C.T.V.). *Intervirology*, **17** 1-199.
- REYNOLDS E.S. (1963). — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.
- SMITH K.M., XEROS N. (1954). — A comparative study of different types of viruses and their capsules in the polyhedroses and granuloses of insects. *Parasitology*, **44**, 400-406.
- STILES B., DUNN P.E., PASCHKE J.D. (1983). — Histoathology of a nuclear polyhedrosis infection in *Aedes epactus* with observation in four additional mosquito species, *J Invertebr. pathol*, **41**, 191.
- SUMMERS M.D. (1977). — Baculoviruses (Baculoviridae). In: *Atlas of insects and plant viruses* (K. MARAMOROSCH ed.) *AC Press New-York*, 3-27.
- TING-WEI C., LING-MEI X., WAN-HUA C., YUAN-YI H. (1980). — Signalement de quelques virus d'insectes forestiers *K'un-ch ung Hsueh Pao*, **23**, 443-444.
- THOMAS G.M., POINAR G.O., Jr (1973). — Report of diagnoses of diseases insects 1962-1972 *Hilgardia*, **42** 261-360.
- VAN DER GEEST L.P.S., VAN DER LAAN P.A. (1972). — Insect pathogens available for distribution. In: *Microbial control of insects and mites* (Burges, H.D. and Hussey, N.W. ed.) *Ac. Press London*, p. 733-739.
- WEBER K., OSBORN M. (1969). — The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* **244** 4406-4412.

SUMMARY

Detection of a nuclear polyhedrosis Baculoviruses in *Latoya viridissima*, Limacodid Lepidoptera, an oil palm and coconut pest in Côte-d'Ivoire.

N.K. KOUASSI, G. FEDIERE, X. LERY, R. PHILIPPE, M. BERGOIN, *Oléagineux*, 1991, **46**, n° 2, p. 53-59

The Limacodid Lepidoptera *Latoya viridissima* is one of the most frequently recorded oil palm leaf-eaters in Côte-d'Ivoire. During outbreaks of this species, natural epizootics allowed us to isolate a Nuclear Polyhedrosis Baculovirus, which affects this species in addition to a Picornavirus previously reported. Globular polyhedrosis measuring between 1 and 1,5 µm in diameter are located in the nucleus of intestinal cells. They contain virions 340 nm long and 50 nm in diameter, occluded in a paracrystalline structure mainly consisting of polyhedrin (MW = 30000 daltons). The genome of this Baculovirus is a double stranded DNA with an estimated NW of 62×10^6 daltons or 94 kb. The digestion of the viral genome with *Eco* RI and *Bam* HI restriction enzyme generated 15 and 8 fragments respectively. Infection of *Latoya viridissima* primary cells cultures of haemocyte with virus extracted from dissolved polyhedra has been successfully achieved in the laboratory.

RESUMEN

Evidencia de un Baculovirus de poliedrosis nuclear en *Latoya viridissima* lepidóptero limacodidae plaga de la palma africana y del cocotero en Côte-d'Ivoire.

N.K. KOUASSI, G. FEDIERE, X. LERY, R. PHILIPPE, M. BERGOIN, *Oléagineux*, 1991, **46**, n° 2, p. 53-59.

Entre los defoliadores de la palma africana, el lepidóptero Limacodidae *Latoya viridissima* es uno de los más frecuentes en Côte-d'Ivoire. Durante la fase de pululación de esta especie, aprovechando epizootias naturales hemos logrado evidenciar un Baculovirus de poliedrosis nuclear, que infecta a esta especie en asociación con un Picornavirus. Los poliedros, de forma globular, miden de 1 a 1,5 µm de diámetro, y se hallan en el núcleo de las células intestinales. Contienen viriones de 340 nm de largo y 50 nm de diámetro, presos en una trama polipeptídica constituida principalmente por poliedrina (PM = 30.000 daltons). El genoma de este Baculovirus es un ADN bicatenario de PM estimado en 62×10^6 daltons, o sea 94 kb. La acción de las enzimas de restricción *Eco* RI y *Bam* HI en este ADN genera respectivamente 15 y 8 fragmentos. La infección de cultivos primarios de hemocitos de *Latoya viridissima*, a partir de virus extraído por disolución de poliedro, se acertó en laboratorio.

Detection of a nuclear polyhedrosis Baculoviruses in *Latoia viridissima*, Limacodid Lepidoptera, an oil palm and coconut pest in Côte-d'Ivoire.

N.K. KOUASSI (1), G. FEDIERE (1), X. LERY (1), R. PHILIPPE (2), M. BERGOIN (3)

Key words : *Latoia viridissima*, entomopathogens, nuclear polyhedrosis Baculovirus.

INTRODUCTION

In Asia, America and Africa, Limacodid Lepidoptera are reported as being among the major oil palm and coconut defoliators (Genty *et al*, 1978 ; Mariau *et al* . 1981 ; Cock *et al* , 1987). Several species of this family have been the subject of specific studies to detect viruses responsible for epizootics (Desmier de Chenon *et al* , 1988).

Several types of RNA or DNA viruses including Baculoviruses, Densovirus, Picornaviruses and viruses of the β nudaurelia group, have already been identified and some of them considered for possible use as entomopathogens in biological control.

A Densovirus isolated from *Casphalia extranea* (Fediere, 1981) and a Picornavirus found in *Latoia viridissima* (Fediere, 1983) have already been described in Côte d'Ivoire. These two viruses responsible of severe natural epizootics during outbreaks of these insects in oil palm and coconut plantations. Following the experimental infection of healthy *Latoia viridissima* larvae with a crude extract of virus-infected larvae, examination of midgut fragments under the electron microscope revealed the presence of polyhedra in the cell nuclei.

In this paper we present the ultrastructural description of a new Baculovirus isolated from *Latoia viridissima* , and its partial biochemical characterization. The results show that the virus belongs to the nuclear polyhedrosis group of Baculoviruses in accordance with Summer's criteria (1977).

MATERIALS AND METHODS

Infection method

Latoia viridissima larvae were fed with leaflets sprayed with a suspension of polyhedra (per os infection).

Electron microscopy techniques

The purified virus suspension were deposited on a grid coated with a collodion carbon film. Then negatively contrasted with 1 % phosphotungstic acid or 2 % uranyl acetate, pH 7.4 (Brenner and Horne, 1959).

For the preparation of ultra-thin sections, fragments of different tissues desiccated from *Latoia viridissima* larvae with disease symptoms were fixed in 2 % glutaraldehyde in a 0.1M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 hours at 4 °C. The fixed fragments were embedded in epon after post-fixing in 1 % osmic acid and dehydration with acetone.

These sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963) and observed under an electron microscope

Purification of polyedron

The larvae were grinded in a 0.05 M Tris buffer at pH 7,8 containing 0,06% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate). After filtering through muslin and clarification, the crude extract was centrifuged at 3.000 g for 15 minutes to sediment the polyhedra. Bellet was resuspended and washed three times with tris buffer, then deposited on a sucrose gradient (40 % - 60 % W/W, 100.000 g for 30 minutes). The band containing the polyhedra was collected and diluted in Tris buffer. The polyhedra were then recovered by centrifugation at 75.000 g for 40 minutes and kept in the same buffer at 4 °C.

Virions purification

The virions were released from polyhedra by dissolving them in a 0,125M sodium thioglycolate-carbonate solution, pH 10,5, at 60 °C for 15 minutes. After adding two volumes of Tris buffer, the suspension was placed in ice for 5 minutes to stop the reaction, then clarified at 2.000 g for 4 minutes. The supernatant containing the virions was centrifuged in a sucrose gradient (20 %-50 % W/W) at 60.000 g for 2 hours. The virions, which sedimented into 3 bands, were collected with a peristaltic pump linked to an analyzer system (Bechman UV 5230 spectrophotometer), then centrifuged at 50.000 g for 2 hours. The virions were stored in Tris-EDTA buffer at -20 °C.

Viral DNA extraction

20 μ l of a concentrated SDS solution (250 mg/ml) were added to 1 ml of virion suspension. After incubation in a water bath at 60 °C for 15 minutes, the DNA was purified by phenol extraction. The DNA phase was extensively against TE buffer (Tris 0,01 M disodic EDTA, 0,001 M, pH 8) for 48 hours, then precipitated over night with 0,3 M final sodium acetate at - 20°C in the presence of 2 volumes of cold absolute ethanol. The DNA precipitate was centrifuged at 8.000 g, washed with 70% cold ethanol, dried and kept in TE buffer at -20°C.

Viral protein analysis

The number and the molecular weight of the viral proteins from polyhedra and virions were determined by electrophoresis in polyacrylamide-SDS (8%) gels according to Weber and Osborn (1969). The viral suspension was heated at 100°C for 5 minutes in a denaturing solution mixture (2V/1V) before deposits on the gel. The marker used contained 7 reference proteins : bovine serum-albumin (MW = 66.000), ovalbumin (MW = 45.000), 3 P glyce-raldehyde dehydrogenase (MW = 36.000), carbonic anhydrase (MW = 29.000), trypsinogen (MW = 24.000), trypsin inhibitor (MW = 20.100), lactalbumin (MW = 14.200).

DNA analysis by restriction enzymes

The DNA was digested with restriction enzymes under the conditions described by Maniatis *et al* (1982). The enzymes used, *Eco* RI and *Bam* HI, were purchased from Boehringer Mannheim. The quantity of enzyme used corresponds to 2 to 3 units/ μ g of DNA. DNA fragments were electrophoresed in 0,6 % or 0,7 % horizontal agarose gels 15 x 20 cm in TAE buffer. (Tris-acetate 0,04M ; EDTA 0,001M) containing 0,5 μ l/ml of ethidium bromide. Electrophoresis occurred

(1) Entomovirology Laboratory B.P. V 51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

(2) Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO), station de La Mé, BP 13, Bingerville - Côte-d'Ivoire

(3) Comparative Pathology Research Station, INRA - CNRS 30380 Saint-Christol-Jès-Alès - France.

over night at 40 V (32 mA). The molecular weights of the fragments were estimated using Lambda bacteriophage DNA with *Eco* RI and *Bam* HI enzymes as a reference.

RESULTS

Electron microscopy

Ultra-thin sections of larvae tissue infected by the Baculovirus, showed globular polyhedra in the cells making up the larva's midgut. Midgut cells had hypertrophied nuclei containing polyhedral masses (fig. 1). An examination of other tissues known to be frequently infected by the Baculovirus, such as fat tissue, Malpighian tubules or hypodermis, proved negative.

Virus structure

An examination of purified virus suspensions contrasted with uranyl acetate revealed rod-like virions 340 nm long and 50 nm in diameter (fig. 2). Beside intact virions with typical envelope, degraded particles in the form of free nucleocapsids with a smaller diameter were also observed, some of these nucleocapsids were penetrated by the stain, suggesting that they have been partially degraded.

Electrophoretic analysis of viral proteins

The electrophoretic profiles resulting from solubilization of polyhedra were complex (fig. 3). A major protein with a MW of 30 000 daltons probably corresponds to the polyhedrin (polyhedron protein). At least 11 polypeptides with molecular weights of 14.000, 16.000, 18.000, 19.500, 21.000, 25.000, 28.000, 38.000, 52.000, 60.000 and 70.000 daltons correspond to the major structural components of the viral capsids.

Virus DNA analysis

The patterns of viral DNA fragments generated by the restriction enzymes *Eco* RI *Bam* HI are shown in figure 4. These enzymes generated 15 and 8 fragments, respectively. The molecular weights of these fragments, estimated by using the *Eco* RI and *Bam* HI fragments of bacteriophage lambda DNA as a marker are given in table 1.

An average size of $61,6 \times 10^5$ daltons, i.e. approximately 93 kilo base pairs could be estimated for the genome of the *Latoia viridissima* Baculovirus by summing up the sizes of the *Eco* RI or *Bam* HI fragments.

Multiplication of the virus in primary cultures of *Latoia viridissima* haemocytes.

In the absence of methods for rearing *Latoia viridissima* on an artificial medium, the multiplication of viruses infected to this species can only be achieved by infecting larvae collected in the fields. In this case, it is difficult to control the health conditions of

the larvae collected. As a consequence experimental infection are somewhat uncertain. Obtaining a cell line could make it possible to overcome these difficulties. Toward this end, we cultured haemocytes from this insect and used them to perform infections (Kouassi *et al.*, 1989). Infection assays on primary haemocyte cultures with a purified Baculovirus suspension proved positive. Characteristic hypertrophied nuclei and accumulation of polyhedra were obtained.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In view of its rod-like structure, the way it is occluded in nuclear proteinaceous inclusions, its complex polypeptide composition, and its genome consisting of a DNA with a high molecular weight, the virus described above share the basic characteristics of Nuclear Polyhedrosis Baculoviruses (Croizier and Croizier, 1977 ; Summers, 1977 ; Matthews, 1982).

Although still incomplete the preliminary results of viral DNA analysis by restriction enzymes (*Eco* RI and *Bam* HI) bring the first elements for cartography and sequencing work of this DNA. Likewise, achieving the replication cycle of the virus in primary haemocyte cultures rendered possible for the future the production and utilization of the virus in biological control or as an expression vector, once an established cell line is available.

It is worth noting that different Nuclear Polyhedrosis and granulosis Baculoviruses have already been isolated from other species of Lepidoptera in the Limacodid family (Genty *et al.*, 1978 ; Cock, 1985 ; Smith and Xeros, 1954 ; Thomas and Poinar, 1973 ; Ting-Wei *et al.*, 1980 ; Van Der Geest and Van Der Laan, 1972). These viruses seem to play a significant role in regulating the natural populations of their hosts (Huber, 1986).

In insects, it is not rare to observe small RNA viruses associated with the nuclear polyhedrosis viruses (Jacquemard *et al.*, 1985). Such as the case with the Picornavirus of *L. viridissima* (Fédière, 1983) associated with the virus we described here. The presence of these small viruses in batches of larvae infected naturally or experimentally with nuclear polyhedrosis viruses raises doubts as to the degree of pathogenicity linked to one or other of the viruses.

An original property of this nuclear polyhedrosis observed in *L. viridissima* lies in its tissue specificity which is apparently limited to the cells of the midgut. Indeed although no exhaustive examination of all the larval tissues was undertaken, the absence of polyhedra in fat tissue or hypodermic cells, for example, seems to indicate that this infection differs from the polyorganotropic nuclear polyhedrosis commonly seen in Lepidoptera (Benz, 1963 ; Hamm, 1968). Indeed, in the latter type of infection the midgut cells represent the site of Baculovirus first cycle replication, but formation of polyhedra in this tissue occurs. In contrast, in other groups of insects, especially in Diptera and Hymenoptera, intestine cells are the main or unique site of polyhedron formation (Bird and Whalen, 1953 ; Fedieri, 1980 ; Stiles *et al.*, 1983 ; Brown, 1982).